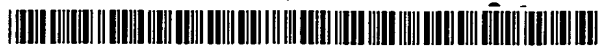


(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

10/521916

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2004 (12.02.2004)

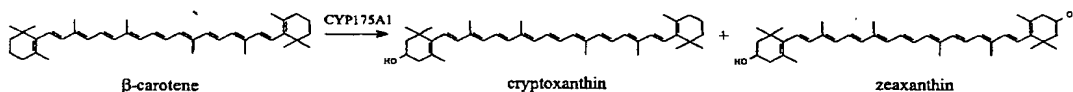
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/013345 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 23/00 (74) Anwalt: KINZEBACH, Werner; Patentanwälte, Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), Sternwartstr. 4, 81679 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008199
- (22) Internationales Anmeldedatum:
25. Juli 2003 (25.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 34 126.5 26. Juli 2002 (26.07.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MATUSCHEK, Markus [DE/DE]; Karolinenstr. 5, 69469 Weinheim (DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowinger Str. 1, 67136 Fussgönheim (DE). SCHMID, Rolf [DE/DE]; In den Riedwiesen 3, 70329 Stuttgart (DE). KAUFFMANN, Isabelle, Melanie [DE/DE]; Riedlinger Str. 8 A, 70327 Stuttgart (DE). BLASCO, Francesca [IT/DE]; Achalmstr. 91, 73734 Esslingen (DE). SCHMIDT-DANNERT, Claudia [DE/US]; 1112 Bucher Ave., Shoreview, MN 55126 (US).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE BIOTRANSFORMATION OF CAROTENOIDS BY MEANS OF A CYTOCHROME P450 MONOOXYGNASE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BIOTRANSFORMATION VON CAROTINOIDEN MITTELS CYTOCHROM P450 MONOOXYGNASE



(57) Abstract: The invention relates to a method for the biotransformation of carotenoids using enzymes having a cytochrome P450 monooxygenase activity, especially monooxygenases of thermophilic bacteria, especially the genus *Thermus* sp.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Biotransformation von Carotinoiden unter Verwendung von Enzymen mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität, insbesondere Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp...

WO 2004/013345 A1

VERFAHREN ZUR BIOTRANSFORMATION VON CAROTINOIDEN MITTELS CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASE

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Biotransformation von Carotinoiden unter Verwendung von Enzymen mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität; insbesondere Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien, insbesondere der Gattung *Thermus* sp. sowie die für derartige Verfahren brauchbaren Mikroorganismen und Expressionskonstrukte.

Stand der Technik

Xanthophylle, wie Zeaxanthin und Cryptoxanthin, sind sauerstoffhaltige Carotinoide und stellen als Pigmentierungsstoffe oder Vorstufen für Vitamin A-Derivate wichtige Zusatzstoffe für die Human- oder Tierernährung dar. Xanthophyllen wird auch eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben. Sie verstärken die Immunantwort und besitzen aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften krebsvorbeugende Wirkung, was sie als Nutraceuticals interessant macht.

Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen die Fähigkeit technisch interessante Oxygenierungsreaktionen zu katalysieren und werden daher seit einiger Zeit intensiv untersucht. So wurde beispielsweise die Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* isoliert und charakterisiert und ist mittlerweile auf rekombinantem Weg zugänglich (vgl. z.B. DE-A-199 35 115).

Diese Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge. Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome.

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Substratbindungsstelle liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten begrenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind. Durch gezielte Einführung von Punktmutationen ist es zwischenzeitlich

gelingen, das Substratspektrum dieses Enzyms zu erweitern. So können nunmehr auch kürzer- als auch längerkettige Carbonsäuren, Alkane, Alkene, Cycloalkane, Cycloalkene und verschiedenste Aromaten durch dieses Enzym oxidiert werden (vgl. DE-A-199 35 115, 199 55 605, 100 11 723 und 100 14 085).

5

Aus der WO-A-02/33057 sind Cytochrom P450-Monooxygenasen aus thermophilen Bakterien bekannt, welche zur Biotransformation verschiedener organischer Substrate geeignet sind. Carotinoide, wie z.B. β -Carotin ist darin nicht als potentielles Substrat der Cytochrom P450-Monooxygenasen genannt.

10

Die DE-A-199 16 140 beschreibt eine Carotinhydroxylase aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* welche unter anderem die Umsetzung von β -Carotin zu Zeaxanthin und Cryptoxanthin katalysiert. Es findet sich kein Hinweis auf die mögliche Brauchbarkeit von Cytochrom P450-Monooxygenasen bei der Biotransformation von β -Carotin.

15

Um die industrielle Anwendbarkeit der Enzymklasse der Cytochrom P450-Monooxygenasen weiter zu verbessern, wäre es daher wünschenswert neue Anwendungsgebiete für diese zu finden.

20 Kurze Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung neuer Anwendungsgebiete für Cytochrom P450-Monooxygenasen.

25 Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Oxidation von Carotinoiden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Carotinoid in Gegenwart eines Enzyms mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität, das außerdem zur Carotinoid-Oxidation befähigt ist, umsetzt und das Oxidationsprodukt isoliert

30 Ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität, das außerdem zur Carotinoid-Oxidation befähigt ist, bewirkt erfindungsgemäß, dass am Kohlenstoff in Position 3 eines β -Iononringes oder dass am Kohlenstoff in Position 3 eines 4-Keto- β -iononringes eine Hydroxylgruppe eingeführt wird.

35 Beispiele für geeignete Carotinoide sind β,β -Carotin (im folgenden bezeichnet β -Carotin), β,ϵ -Carotin oder Canthaxanthin.

Eine Carotin-Oxidation im Sinne der Erfindung umfasst die einfache oder mehrfache Hydroxylierung des Carotins.

Erfindungsgemäß anfallende Oxidationsprodukte umfassen vorzugsweise Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Adonirubin, Astaxanthin, Lutein oder Gemische davon.

Detaillierte Beschreibung

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf beiliegenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

Figur 1 einen Sequenzvergleich von P450 aus *Thermus thermophilus* mit der Häm-Domäne von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. Doppelt unterstrichen ist dabei die Häm-Bindungsstelle gezeigt (Cys400 in P450 BM3 ist der Cysteinrest, der mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe koordiniert). Einfach unterstrichen ist die Region die in Kontakt steht mit dem T-Ende der Fettsäurekette. Die Grad der Übereinstimmung ist durch verschiedenen Symbole gekennzeichnet ("*" = identische Reste; ":" und "." = ähnliche Reste).

Figur 2 zeigt das Ergebnis eines Vergleichstests zur Bestimmung der Thermostabilität von P450 BM3 und P450 aus *Thermus* sp.. Die Thermostabilität wurde spektrometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500nm über den Häm-Gruppen-Gehalt bestimmt.

Figur 3 zeigt ein Reaktionsschema für die erfindungsgemäße Biotransformation von β -Carotin zu Cryptoxanthin und Zeaxanthin.

Figur 4 zeigt das HPLC-Elutionsprofil von Standardproben, enthaltend β -Carotin, Zeaxanthin bzw. Cryptoxanthin.

Figur 5 veranschaulicht die Ergebnisse von Biotransformationsexperimenten mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen, welche neben den Carotinogenen Gene *crtE*, *crtB*, *crtI* und *crtY* (Figur 5A) mit einem erfindungsgemäßen Konstrukt pKK_CYP transformiert sind (Figur 5B); in Gegenwart von pKK_CYP beobachtet man eine signifikante Produktion von Zeaxanthin und Cryptoxanthin.

a) Verfahren zur Carotinoid-Oxidation

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Oxidation von Carotinoiden, wie z.B. von β -Carotin, wobei man

- 5 a1) einen rekombinanten Mikroorganismus, welcher ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität produziert, in einem Kulturmedium in Gegenwart von exogenem oder intermediär gebildetem Carotinoid kultiviert; oder
- a2) ein Carotinoid-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität inkubiert; und
- 10 b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Bedingungen durchgeführt, welche die Oxidation von Carotinoiden, wie β -Carotin, vorzugsweise fördern, zumindest aber nicht behindern oder gar inhibieren. Bevorzugt erfolgt die Oxidation durch Kultivierung des rekombinanten Mikroorganismus in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20 bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9.

Bevorzugt verwendet man solche Mikroorganismen, die durch heterologe Komplementierung zur Carotinoidproduktion, wie z.B. zur β -Carotinproduktion, befähigt sind und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimieren. Heterolog komplementierte E. coli-Stämme und weitere Mikroorganismen in welche in analoger Weise eine erfindungsgemäße P450-Monooxygenase-Aktivität (mit Carotinoid-oxidierender Aktivität) eingebaut werden kann, werden z.B. in der oben genannten DE-A-199 16 140 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich bezug genommen wird.

Nach einer anderen bevorzugten Variante wird Carotinoid, wie z.B. β -Carotin, als exogenes Substrat einem Medium zugesetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltigen Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchgeführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthalten kann.

Obige Verfahren können bevorzugt in Bioreaktoren durchgeführt werden. Gegenstand der Erfindung sind daher solche Bioreaktoren, umfassend wenigstens eine erfindungsgemäße Monooxygenase oder wenigstens einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus, gegebenenfalls jeweils in immobilisierter Form.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Monooxygenaseproduktion in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

Wird die erfindungsgemäße Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst oder solubilisiert man das erfindungsgemäße Enzym in einem exogenes Substrat enthaltenden Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM), und führt die Umsetzung, vorzugsweise in Gegenwart von Sauerstoff, bei einer Temperatur von etwa 10 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Substrat-haltige Medium außerdem bezogen auf das zu oxidierende Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten (Elektronendonator) enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Beim erfindungsgemäßen Substratoxidationsprozess wird im Reaktionsmedium enthaltener oder zugesetzter Sauerstoff reduktiv enzymatisch gespalten. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden von dem zugesetzten Reduktionsmittel (Elektronendonator) zur Verfügung gestellt.

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion und/oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und bedürfen daher keiner besonderen Erläuterung.

Besonders bevorzugt sind Verfahren bei denen die eingesetzte Cytochrom P450 Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst; und gegebenenfalls außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.

Besonders bevorzugt sind Verfahren unter Verwendung einer Monooxygenase, die eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus

den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen; und insbesondere Verfahren unter Verwendung einer Monooxygenase, die eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

5

Wird das erfindungsgemäße Verfahren mit Hilfe von Mikroorganismen durchgeführt, so kultiviert man einen rekombinanten Mikroorganismus, der ein Expressionskonstrukt trägt, welches unter der Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition umfasst.

10

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition oder einer dafür kodierenden Nukleotidsequenz zur mikrobiologischen Oxidation von Carotinoiden, wie z.B. β -Carotin.

15 b) Rekombinante Mikroorganismen zur Durchführung des Verfahrens

Gegenstand der Erfindung sind außerdem rekombinante Mikroorganismen, welcher durch heterologe Komplementierung zur Carotinoidproduktion, wie z.B. zur β -Carotinproduktion, befähigt sind und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimieren. Solche Mikroorganismen sind vorzugsweise mit carotinogenen Genen, wie z.B. crtE, crtB, crtI und crtY, heterolog komplementiert. Sie sind insbesondere abgeleitet von Bakterien der Gattung Escherichia sp, wie E. coli, insbesondere E. coli JM 109.

20

Erfindungsgemäße Mikroorganismen sind insbesondere transformiert mit einem Expressionsvektor, der unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition umfasst.

25

Ein bevorzugter Expressionsvektor, umfassend die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß obiger Definition enthält stromaufwärts davon den starken tac-Promotor und stromabwärts den starken rrnB ribosomalen Terminator in operativer Verknüpfung.

30

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind z.B. aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

35

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen P450-Enzyme mit Carotinoid-, insbesondere β -Carotin-oxidierender Aktivität oder eine dafür kodierende Nukleinsäuresequenz zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen, insbesondere zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

5

Ferner betrifft die Erfindung entsprechend genetisch veränderte Organismen, wobei die genetische Veränderung die Genexpression der erfindungsgemäßen Carotinoid- insbesondere β -Carotin-oxidierenden Aktivität gegenüber einem Wildtyp für den Fall, dass der Ausgangsorganismus das erfindungsgemäß verwendete Gen enthält, erhöht oder für den Fall, dass

10

der Ausgangsorganismus das erfindungsgemäß verwendete Gen nicht enthält, verursacht.

Unter einem genetisch veränderten Organismus wird ein Organismus verstanden, in dem die erfindungsgemäßen P450 Gene oder Nukleinsäurekonstrukte, vorzugsweise nach einer der hierin beschriebenen Methoden, insertiert wurden.

15

Der genetisch veränderte Organismus enthält mindestens ein erfindungsgemäßes Carotinoid-, insbesondere β -Carotin-oxidierendes-Gen oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt. Je nach Ausgangsorganismus kann die Nukleinsäure chromosomal oder extrachromosomal vorliegen.

20

Vorzugsweise weisen die genetisch veränderten Organismen verglichen mit dem Wildtyp einen veränderten Carotinoid-Stoffwechsel auf.

25

Als genetisch veränderte Organismen eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind, Carotinoide oder Xanthophylle zu synthetisieren.

Bevorzugt sind Ausgangsorganismen, die natürlicherweise Xanthophylle synthetisieren können. Aber auch Ausgangsorganismen, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, sind geeignet.

30

Unter Ausgangsorganismen werden prokaryontische oder eukaryontische Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

35

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung Esche-

richia, die beispielsweise crt-Gene aus Erwinia enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes oder Cyanobakterien der Gattung Synechocystis. Bevorzugte Bakterien sind Escherichia coli, Erwinia herbicola, Erwinia uredovora, Agrobacterium aurantiacum, Alcaligenes sp. PC-1, Flavobacterium sp. strain R1534, das Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803, Paracoccus marcusu, oder Paracoccus carotinifaciens.

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Blakeslea, Phycomyces, Fusarium oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Besonders bevorzugte Algen sind Haematococcus pluvialis oder Dunaliella bardawil.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet. Bevorzugte Pflanzen sind beispielsweise Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlrarten, Hafer, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Brassicaceae, wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind Arabidopsis thaliana, Tagetes erecta, Raps, Canola, Kartoffeln sowie Ölsaaten und typische Carotinoidproduzenten, wie Soja, Sonnenblume, Paprika, Karotte, Pfeffer oder Mais.

c) Enzyme, Polynukleotide und Konstrukte

Erfindungsgemäß brauchbare Cytochrom P450 Monooxygenasen sind insbesondere aus thermophilen Bakterien, vorzugsweise der Gattung *Thermus* sp., wie z.B. der Spezies *Thermus thermophilus*, Stamm HB27 (hinterlegt bei der DSM unter der Nummer DSM7039) isolierbar. „Thermophile“ Bakterien erfüllen erfindungsgemäß die Temperaturtoleranzkriterien nach H.G. Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage, Seite

173, für thermophile und extrem thermophile Organismen (d.h. Wachstumsoptimum bei über 40 °C).

Die erfindungsgemäß bevorzugt verwendeten Monooxygenasen sind vorzugsweise durch eine erhöhte Temperaturstabilität gekennzeichnet. Diese drückt sich in einem in Vergleich zum P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium* geringeren Aktivitätsverlust bei erhöhter Temperatur (z.B. in einem Bereich von 30 bis 60 °C, pH 7,5, 25mM Tris/HCl) aus.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird erfindungsgemäß eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus dem thermophilen Bakterium *T. thermophilus* verwendet. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 44 kDa (bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese), ist löslich und zeigt im reduzierten Zustand, oxidierten Zustand und als Carbonyl-Addukt ein Absorptionsspektrum analog zu dem anderer P450 Enzyme. Aus Sequenzvergleichen dieses erfindungsgemäßen Enzyms aus *T. thermophilus* und anderen bekannten P450 Enzymen konnten folgende Identitäten bestimmt werden: P450 BM3, 32% Identität; CYP119, 29% Identität; P450eryF, 31% Identität. Das erfindungsgemäße Enzym zeigt eine außerordentliche Thermostabilität, veranschaulicht durch eine Schmelztemperatur von etwa 85°C, welcher Wert um 30°C über demjenigen für P450cam liegt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von Polynukleotiden, welche für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren, insbesondere eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus der Gattung *Thermus* sp. in Verfahren zur Oxidation von β -Carotin.

Bevorzugte Polynukleotide sind solche, die im wesentlichen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzen, sowie die dazu komplementären und davon abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von Expressionskassetten oder von rekombinanten Vektoren zur Herstellung von rekombinanten Mikroorganismen, welche zu den erfindungsgemäßen Umsetzungen brauchbar sind.

Erfindungsgemäß mit umfasst ist ebenfalls die Verwendung „funktionaler Äquivalente“ der konkret offenbarten neuen P450 Monooxygenasen zu den erfindungsgemäßen Umsetzungen.

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Monooxygenasen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Enzyme, welche weiterhin die ge-

wünschte Substratspezifität im Rahmen der oben bezeichneten Oxidationsreaktion besitzen und /oder im Vergleich zu P450 BM3 eine erhöhte Thermostabilität, z.B. bei Temperaturen im Bereich von etwa 30 bis 60 °C und gegebenenfalls höheren Temperaturen nach 30-minütiger Behandlung in 25mM Tris/HCl, besitzen.

5

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten Oxidationsreaktionen katalysieren. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere, wie z.B. 1 bis 30 oder 1 bis 20 oder 1 bis 10, Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Enzym qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

10

15

20

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ weisen eine von SEQ ID NO:2 in mindestens einer Position abweichende Aminosäuresequenz auf, wobei die Veränderung in der Sequenz die Monooxygenase Aktivität vorzugsweise nur unwesentlich, das heißt um nicht mehr als etwa $\pm 90\%$, insbesondere $\pm 50\%$ oder nicht mehr als $\pm 30\%$ verändert. Diese Veränderung kann unter Verwendung eines Referenzsubstrates, wie zum Beispiel β -Carotin, unter standardisierten Bedingungen (zum Beispiel 0,1 bis 0,5 M Substrat, pH-Bereich 6 bis 8, insbesondere 7; T = 30 bis 70°C) bestimmt werden.

25

30

35

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens 75% insbesondere wenigstens 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins.

Homologe des erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

„Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch P450-Monooxygenasen, welche aus anderen Organismen, z.B. aus anderen als den hierin konkret genannten Bakterien, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

- Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen (einzeln und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen), kodierend für eine der obigen Monooxygenasen und deren funktionale Äquivalente zur Durchführung obiger Verfahren. Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Eigenschaftsprofil.
- 10 Alle hierin erwähnten Nukleinsäuresequenzen sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Biochemie, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- 20 Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.
- 30 Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.
- 35

- Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu
- 5 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-
- 10 Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden.
- 15 Diese Nukleinsäuren sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-
- 20 stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz be-
- 25 stimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.
- 30 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen inser-
- 35 tiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die

Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -PR- oder λ -PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_P-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Monooxygenase-Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89).

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMF α (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Pflanzen-Expressionsvektoren, wie solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W.

(1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.

Säugetier-Expressionsvektoren, wie pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195).

Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäß verwendeten Enzyme und/oder zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, Blakeslea, Phycomyces, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mit-

tels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen oder Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Monooxygenasen können auch rekombinant hergestellt werden, wobei man einen Monooxygenase-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Monooxygenase induziert und die Monooxygenase aus der Kultur isoliert. Die Monooxygenase kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Monooxygenase nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und das Enzym nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Monooxygenase kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, T. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die DNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

BeispieleAllgemeine experimentelle Angaben:

5 a) Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

15 b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne MgCl₂, 8µl MgCl₂ (25mM), je 1 µl Primer (0,1 µM), 1µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

20 c) Kultivierung von E.coli

Die Kultivierung von rekombinanten E. coli-Stämme DH5α erfolgte in LB-Amp Medium (Trypton 10,0g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H₂O ad 1000 ml) bei 37 °C. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in E. coli erfolgte nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42 °C.

30 d) Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g E. coli DH5α wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20 %)

wurde die auf Eis gekühlte E. coli-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 mm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert, wobei man einen Rohextrakt erhält.

5 Beispiel 1:

Klonierung und Expression von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 und den His-tag-Derivaten davon

1. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27

10 Ein die kodierende P450-Sequenz (im folgenden auch als CYP175A1-Gen ezeichnet) umfassender Klon (TTHB66) wurde aus einer *Thermus* Genbank gewonnen. Die kodierende P450-Sequenz (blunt ended) wurde in die HincII-Schnittstelle des Plasmids pTZ19R (MBI Fermentas) einkloniert. Aus dem so erhaltenen Plasmid TTHB66 wurde die kodierende
15 P450-Sequenz mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450-ATG-Startcodons:

5'-CGAAGCT**CATATGA**AGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7).

20 b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stopcodons:

5'-GCG**AATTC**ACGCCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

25 Das resultierende Fragment wurde in die NdeI-Schnittstellen des Vektors pCYTEXP1 (Plasmid mit dem temperaturinduzierbaren P_{RPL} -Promotorsystem des Bakteriophagen 8 (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26:147)) kloniert und in E. coli DH-5 α (Clontech, Heidelberg) transformiert.

30 E. coli DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des
35 P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	0,092	0,056
8	0,176	0,106
24	0,106	0,064

5 2. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit N-terminalem His-tag

Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

- 10 (a) 50-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Startcodons und die tag-kodierenden Codons (unterstrichen):
5'-CGAAGCT**CATATG**CATCACCATCATCATCAAAGCGCCTTTC (SEQ ID NO:9);
- 15 (b) 30-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons :
5'-G**CGAATTC**ACGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:8).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 kloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

- 20 *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid, wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des
- 25 P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	ND	ND
8	0,097	0,073
24	0,111	0,073

3. Klonierung von P450 aus *Thermus thermophilus* HB27 mit C-terminalem His-tag

5 Die kodierende P450-Sequenz wurde durch PCR aus dem Plasmid TTHB66 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

(a) 30-mer sense-Oligonucleotid, enthaltend die NdeI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des P450 ATG-Start-Codons:

10 5'-CGAAGCT**CATATGA**AGCGCCTTTCCCTGAG (SEQ ID NO:7)

(b) 47-mer antisense-Oligonucleotid, enthaltend die EcoRI-Schnittstelle (kursiv gedruckt) als Teil des TGA-Stop-Codons sowie die unterstrichene tag-kodierende Teilsequenz:

15 5'-CGGA**ATTCAGT**GATGATGATGGTGATGCGCCCGCACCTCCTC (SEQ ID NO:10).

Das resultierende Fragment wurde in die NdeI- und EcoRI-Schnittstellen des Vektors p-CYTEXP1 cloniert und in *E. coli* DH-5 α exprimiert.

20 *E. coli* DH-5 α , enthaltend das interessierende Plasmid wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin inokuliert und die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Probe wurde in frisches LB-Medium (in Gegenwart von Ampicillin) inokuliert und die resultierende Kultur wurde bei 37 °C bis zu OD = 0,9 kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Temperatur auf 42 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Veränderung des

25 P450-Gehaltes während der Expression wurde anhand von Messungen des CO-Differenzspektrums bestimmt.

Expressionszeit [h]	$\Delta A_{450-490}$	P450 Konzentration [μ M]
4	ND	ND
8	0,1	0,075
24	ND	ND

Beispiel 2:

5 Bestimmung der Thermostabilität von P450 aus *Thermus thermophilus* im Vergleich zu P450 BM3

Die beiden Enzyme wurden jeweils 30 Minuten in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25mM bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend abgekühlt und die P450 Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt und in Figur 2 graphisch dargestellt.

Temperatur [°C]		30	40	50	60
P450 Konzentration [%]	P450 thermus	100	89	29	22
	P450 BM3	92	63	0	0

15 Wie man den Versuchsergebnissen entnimmt, besitzt das erfindungsgemäße Enzym nach 30-minütiger Inkubation bei allen Temperaturen eine signifikant höherer Thermostabilität.

Beispiel 3:

20 Herstellung eines Expressionsvektors für Cytochrom P450 Monooxygenase aus *T. thermophilus* HB 27

25 Es wurde von Plasmid-DNA (Klon TTHB66), enthaltend die kodierende Sequenz der Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP175A1-Gen) ausgegangen. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden Restriktionsschnittstellen EcoRI und PstI in das CYP175A1-Gen eingeführt. Mit Hilfe der folgenden Primer wurde das Gen amplifiziert:

5'-CCGGAATTCATGAAGCGCCTTCCCTGAGG; (SEQ ID NO: 11)

5-CCAATGCATTGGTTCTGCAGTCAGGCCCGCACCTCCTCCCTAGG (SEQ ID NO:12)

Die neuen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Das Reaktionsgemisch für die PCR bestand aus Template-DNA (100 ng), 2,5 U pfu DNA Polymerase (Stratagene), 5 µl Reaktionspuffer, 5 µl DMSO, 0,4 µmol jedes Oligonukleotids, 400 µmol dNTPs und H₂O ad 50 µl. Folgende PCR Zyklusparameter wurden eingestellt: 95 °C, 1 Minute; (95 °C, 1 Minute; 53 °C, 1 Minute 30 Sekunden; 68 °C, 1 Minute 30 Sekunden) 30 Zyklen; 68 °C, 4 Minuten. Die CYP175A1-Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Nach Restriktionsverdau des PCR-Produktes wurde das CYP175A1-Gen in die EcoRI und PstI-Schnittstellen des Plasmids pKK 223-3 (Amersham Pharmacia) kloniert. pKK 223-3 enthält den starken tac-Promotor stromaufwärts einer Mehrfach-Klonierungsstelle und den starken rrnB ribosomalen Terminator stromabwärts davon zur Kontrolle der Protein-Expression. Das erhaltene Plasmid trägt die Bezeichnung pKK_CYP.

Beispiel 4:

Biotransformation von β -Carotin in rekombinanten E.coli-Stämmen

Zur β -Carotin-Biotransformation wurden rekombinante E.coli-Stämme hergestellt, welche durch heterologe Komplementation zur β -Carotin-Produktion befähigt waren.

Stämme von E.coli JM109 wurden als Wirtszellen für die Komplementations-Experimente mit den Plasmiden pACYC_Y und pKK_CYP (hergestellt gemäß Beispiel 3) verwendet. Das Plasmid pACYC_Y trägt die Carotinogenen Gene crtE, crtB, crtIC14 und crtY, isoliert aus E. uredovora. Die genannten Gene wurden jeweils mit einem eigenen lac-Promoter einkloniert, um die Expression zu ermöglichen. Die Herstellung dieses Plasmids ist beschrieben in der Dissertation von I. Kauffmann, *Erhöhung mikrobieller Diversität von Carotinoiden*, Juni 2002, Institut für Technische Biologie, Universität Stuttgart. Das die Carotinogenen Gene crtE, crtB, crtIC14 enthaltende Vorläuferkonstrukt ist beschrieben in Schmidt-Dannert (2000), Curr. Opin. Biotechnol. 11, 255-261.

Weitere Details zur heterologen Komplementation sind beispielsweise auch beschrieben in Ruther, A. *Appl. Mikrobiol. Biotechnol.* (1997) 48: 162–167; Sandmann, G., *Trends in Plant Science* (2001) 6: 1, 14–17 und Sandmann, G. et al., TIBTECH (1999), 17: 233–237.

Auf die Offenbarung der oben genannten Druckschriften wird hiermit ausdrücklich bezug genommen.

Kulturen von E.coli JM109 wurden in an sich bekannter Weise mit den Plasmiden pACYC_Y und pKK_CYP transformiert und in LB-Medium bei 30 °C bzw. 37 °C zwei Tage kultiviert. Ampicillin (1µg/ml) Chloramphenicol (50 µg/ml) und Isopropyl-β-thiogalactosid (1 mmol) wurden in üblicher Weise zugegeben. Als Vergleichsprobe wurde ein E.coli-Stamm JM109 lediglich mit dem Plasmid pACYC_Y transformiert und in gleicher Weise kultiviert.

Zur Isolierung der Carotinoide aus den rekombinanten E.coli-Stämmen wurden die Zellen mit Aceton und anschließend mit Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser partitioniert. Die organische Phase wurde isoliert, zur Trockne eingedampft und über eine DXSIL C8-Säule mit Wasser/Acetonitril (5:95) mit Hilfe der HPLC aufgetrennt. Folgende Verfahrensbedingungen wurden eingestellt:

Trennsäule:	DXSIL C8, 3µm, 120A, 2.1 x 100mm
Flussrate:	0,35mL/min
Eluenten:	isokratisch Wasser / Acetonitril 5 / 95
Detektion:	
	UV_VIS_1.Wellenlänge = 453nm
	UV_VIS_1.Bandbreite = 4nm
	3DFIELD.Max. Wellenlänge = 600nm
	3DFIELD.Min. Wellenlänge = 190nm
	3DFIELD.Ref. Wellenlänge = 399nm
	3DFIELD.Ref. Bandbreite = 40nm

Die Spektren wurden direkt aus den Elutionspeaks unter Verwendung eines Diodenarray-Detektors bestimmt. Die isolierten Substanzen wurden über ihre Absorptionsspektren und ihre Retentionszeiten im Vergleich zu Standardproben identifiziert.

Chromatogramme der Standards für β-Carotin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin sind in den beiliegenden Figuren 4A bis 4C dargestellt. Figur 5 A zeigt die chromatographische Analyse einer Probe erhalten aus dem mit dem Plasmid pACYC_Y transformierten E.coli-Stamm. Es zeigt sich, dass dieser aufgrund der heterologen Komplementation zur Bildung von β-Carotin befähigt ist. Figur 5 B zeigt das Chromatogramm eines erfindungsgemäß hergestellten, zusätzlich mit dem Plasmid pKK_CYP transformierten, heterolog komplementierten E.coli-Stammes. Überraschenderweise zeigt sich hier, dass neben β-Carotin signifikante Mengen der korrespondierenden Hydroxylierungsprodukte Zeaxanthin und Cryptoxanthin nachweisbar sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Oxidation von Carotinoiden, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid in Gegenwart eines Enzyms mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität umsetzt und das Oxidationsprodukt isoliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus, welcher ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität produziert, in einem Kulturmedium in Gegenwart von exogenem oder intermediär gebildetem β -Carotin kultiviert; oder
 - a2) ein β -Carotin-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität inkubiert; und
 - b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Oxidationsprodukt Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Adonirubin, Astaxanthin, Lutein oder Gemische davon umfasst.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oxidation durch Kultivierung des Mikroorganismus in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus durch heterologe Komplementierung zur Carotinoidproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid als exogenes Substrat einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthält.

- 5
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Cytochrom P450 Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
- 10
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
- 15
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.
- 20
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.
- 25
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus Bakterien der Gattung *Thermus* sp. verwendet.
- 30
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus* verwendet.
- 35
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus kultiviert, der ein Expressionskonstrukt trägt, welches unter der Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 12 umfasst.
14. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 12 oder einer dafür kodierenden Nukleotidsequenz zur mikrobiologischen Oxidation von Carotinoiden.

- 5 15. Rekombinanter Mikroorganismus, welcher durch heterologe Komplementierung zur β -Carotinproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.
16. Mikroorganismus nach Anspruch 15, welcher mit carotinogenen Genen heterolog komplementiert ist.
- 10 17. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 15 und 16, abgeleitet von Bakterien der Gattung *Escherichia* sp.
18. Mikroorganismus nach Anspruch 17, abgeleitet von *E. coli*, insbesondere *E. coli* JM 109.
- 15 19. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 15 bis 18, transformiert mit einem Expressionsvektor, der unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 12 umfasst.
- 20 20. Expressionsvektor, umfassend die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 12 welche stromaufwärts mit dem starken *tac*-Promotor und stromabwärts mit dem starken *rrnB* ribosomalen Terminator operativ verknüpft ist.

Fig. 1

```

P450 BM3      TIKEMPQPKTFGELKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKE 60
P450 thermus  -MKRLSLREAWPYLKDLQDD---PLAVLLAWGRAHPRLFLPLPRFFIALIFDPE-GVEG 54
               :*:. . :. : **:*          * :.*: . . :.* . :. : . :. : :
               :

P450 BM3      ACDESRFDKNLSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKKAHNILLPSFSQAMKGYHAMMV 120
P450 thermus  ALLAEGTTKATFQYRALSR-LTGRGLLTDWG--ESWKEARKALKDPFLPKNVRGYREAME 111
               * . * * : * :.* **:*.* :.***:.* * . * : :.***: *
               :

P450 BM3      DIAVQLVQKWERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVRA 180
P450 thermus  EEARAFFGEWR----GEERDLDEMLALSRLRLGRALFGKPLSPSLAEH-----ALKA 160
               : * :. :.* .*. :. :.* *:* * . * . :. . :. : :. :
               :

P450 BM3      LDEAMNKLQRANPDDPAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDDLTHMLNG 240
P450 thermus  LDRIMAQTR--SPLALLDLAAEARFR-----K--DRGALYREAEALIVHPPLS 204
               **. * : : . * : :.* : :.* ** * :. :. :.* * .
               :

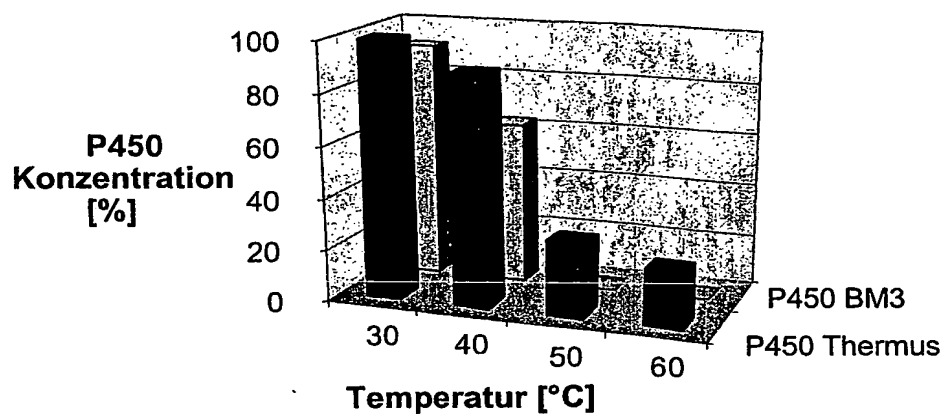
P450 BM3      KDPETGEPLDDENIRYQIITFLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVD 300
P450 thermus  HLP-----RERALSEAVTLLVAGHETVASALTWSFLLLSHRPDWQKRVAESEEAAALAA 257
               : * * . : :.*:*****. . * :. :. :.* :. :.* . * .
               :

P450 BM3      PVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLWPTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDELMVLIPOQL 360
P450 thermus  -----FQEALRLYPPAWILTRRLERPLLLG-EDRLPPG-TTLVLSPYV 298
               : :*****:.* * :. :. :.* * * * * :.* * :
               :

P450 BM3      HRDKTIWGDDVEEFRPERFENPSAIPQHAFKPFNGCORACIGQOFALHEATLVLGMLMKH 420
P450 thermus  TQRLHFP--DGEAFRPERFLEERGTPSGRYFPFGLGQRLCLGRDFALLEGPVLRAFFRR 356
               : : * * * : : . * . : *** ** * :.*:*** * . :.* :. :
               :

P450 BM3      FDFEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVAKSKKIPLGGIPS-PSTEQSAKKVR 471
P450 thermus  FRLDPLP--FPRVLAQVTLRPE-----GGLPARPREEVRA--- 389
               * :. . : :.*:** **:*: * * *
               :

```

Fig.2**BEST AVAILABLE COPY**

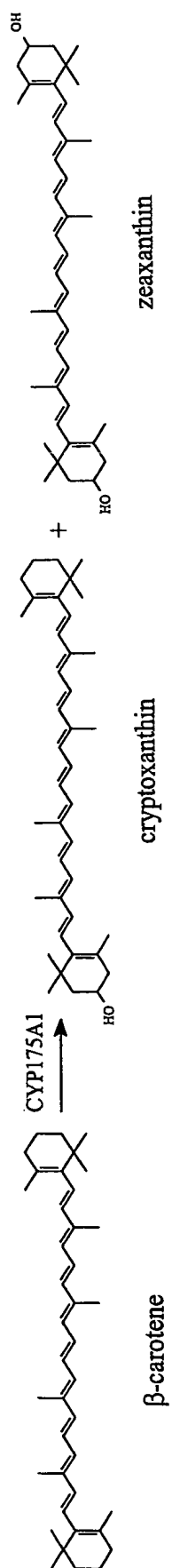


Fig. 3

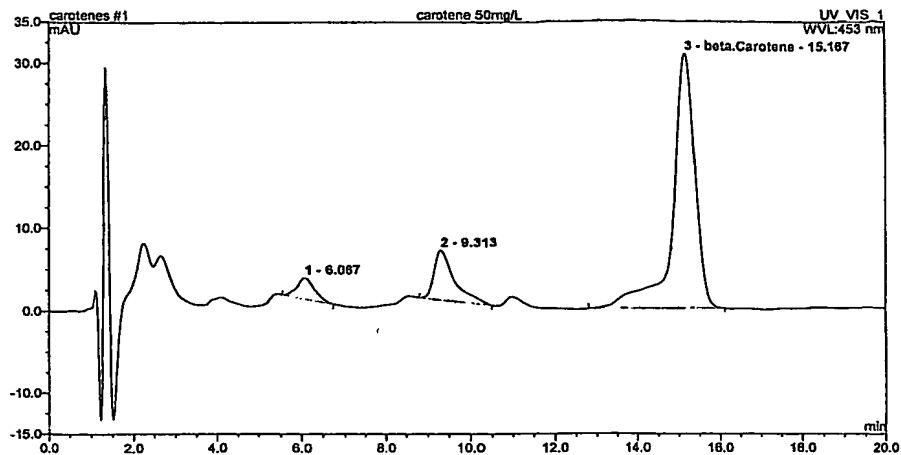
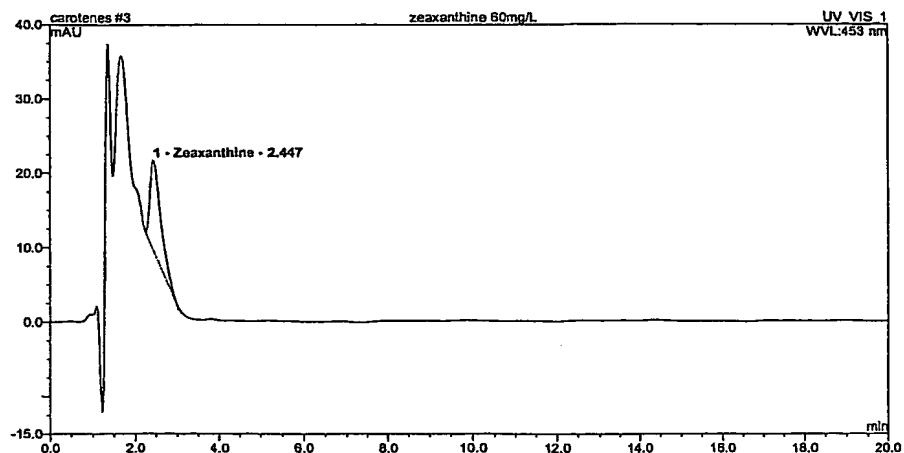
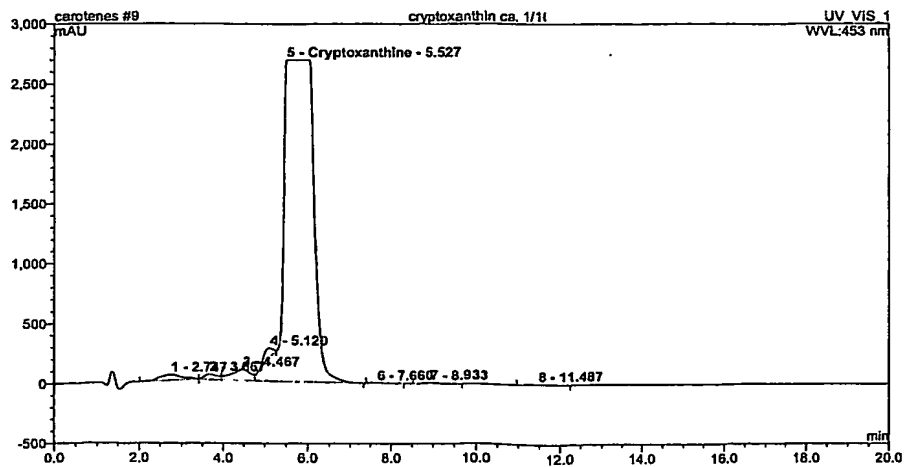
FIG. 4A: BETA - CAROTIN (Standard):**FIG. 4B: ZEAXANTHIN (Standard):****FIG 4C: Cryptoxanthin (Standard):**

FIG. 5A:

Probe Y (*E. COLI* enthaltend *CRTE*, *CRTB*, *CRTI* AND *CRTY* aus *E. UREDOVORA*):

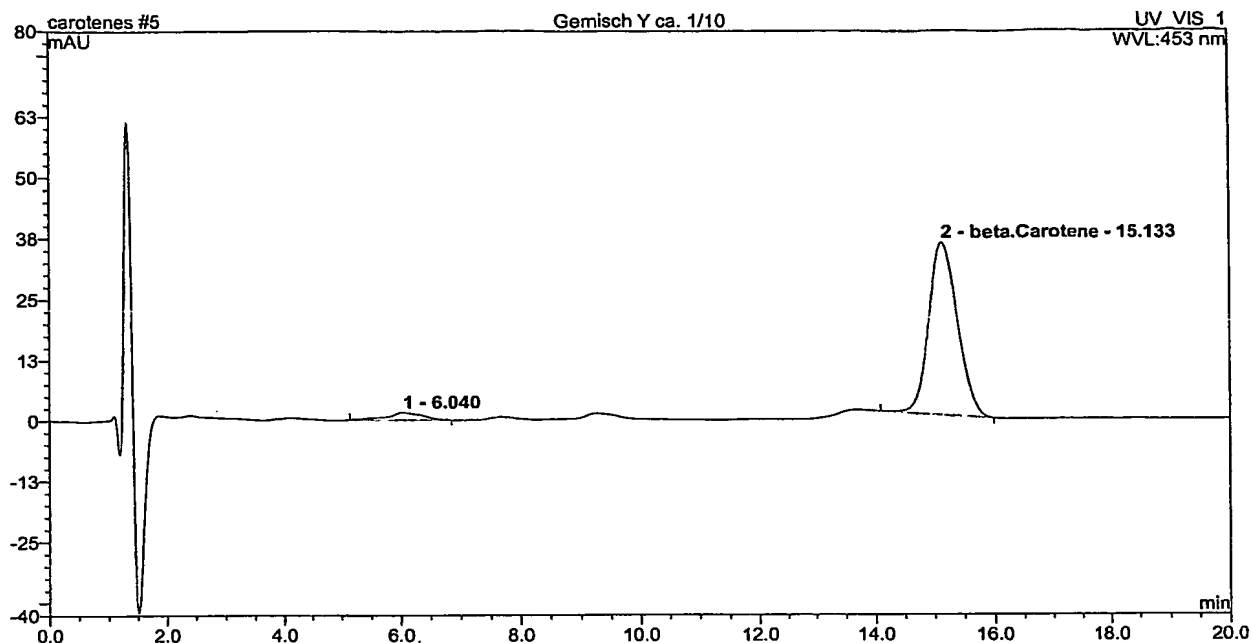
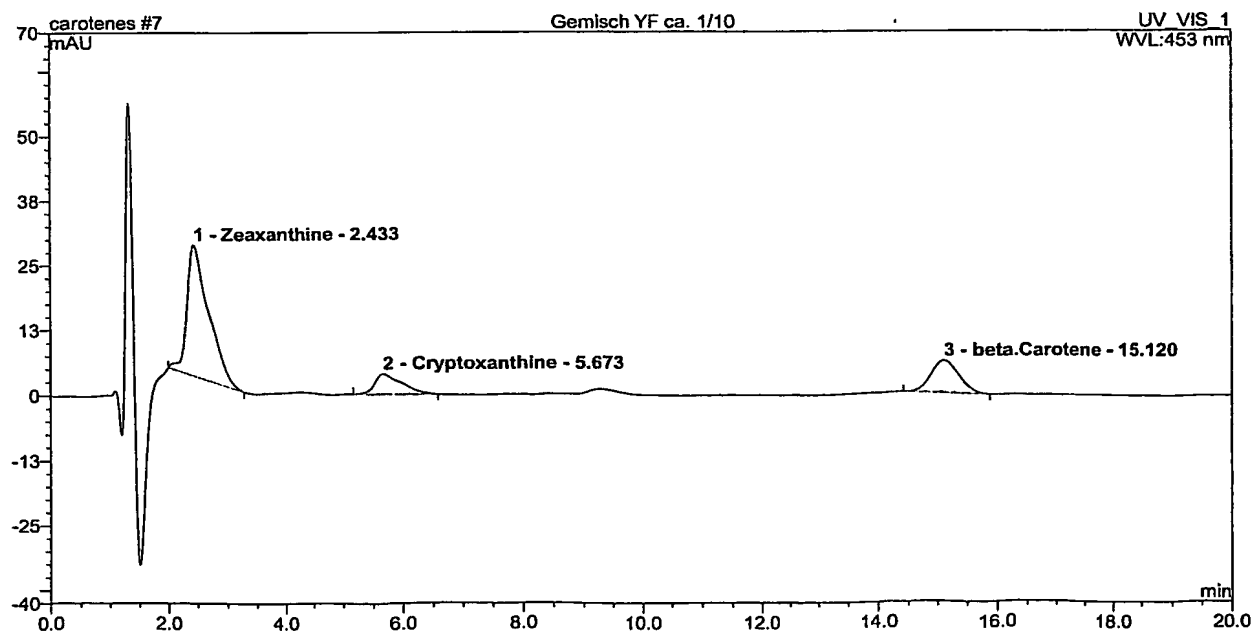


FIG. 5B:

Probe YF (*E. coli* enthaltend *CRTE*, *CRTB*, *CRTI* AND *CRTY* AUS *E. UREDOVORA* + *PKK_CYP*):



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Verfahren zur Biotransformation von Carotinoiden

<130> M43191 beta-Karotin Biotransformation

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

<213> Thermus thermophilus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1170)

<400> 1

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc	48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu	
1 5 10 15	

cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc	96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro	
20 25 30	

cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35 40 45	

ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	

acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	

acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	

ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
 gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
 gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	
 ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc	480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala	
145 150 155 160	
 ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac	528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
 ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc	576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	
180 185 190	
 gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga	624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	
195 200 205	
 gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag	672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	
210 215 220	
 acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc	720
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg	
225 230 235 240	
 ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc	768
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala	
245 250 255	
 gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc	816
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr	
260 265 270	
 cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg	864
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro	
275 280 285	

ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc 912
 Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg 960
 Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320

acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc 1008
 Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335

ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc 1056
 Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350

ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc 1104
 Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365

gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg 1152
 Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380

gag gag gtg cgg gcg tga 1170
 Glu Glu Val Arg Ala
 385 390

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 2

Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140

Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 145 150 155 160

Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg
 180 185 190

Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
 195 200 205

Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
 210 215 220

Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
 225 230 235 240

Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
 245 250 255

Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
 260 265 270

Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
 275 280 285

Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
 290 295 300

Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
 305 310 315 320

Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
 325 330 335

Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
 340 345 350

Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
 355 360 365

Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
 370 375 380

Glu Glu Val Arg Ala
 385

<210> 3

<211> 1188

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(21)

<223> His tag

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal
 his tagged

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 3

atg cat cac cat cat cat cac aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg 48
 Met His His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1 5 10 15

ccc tac ctg aaa gac ctc cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg 96
 Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
 20 25 30

tgg ggc cgg gcc cac ccc cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc 144
 Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
 35 40 45

ctg gcc ctg atc ttt gac ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc	192
Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala	
50 55 60	
 gag ggg acc acc aag gcc acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc	240
Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu	
65 70 75 80	
 acg ggg agg ggc ctc ctc acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg	288
Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala	
85 90 95	
 cgc aag gcc ctc aaa gac ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac	336
Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr	
100 105 110	
 cgg gag gcc atg gag gag gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg	384
Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg	
115 120 125	
 ggg gag gag cgg gac ctg gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc	432
Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
 ctc ctc ggg cgg gcc ctc ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg	480
Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala	
145 150 155 160	
 gag cac gcc ctt aag gcc ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc	528
Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser	
165 170 175	
 ccc ctg gcc ctc ctg gac ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac	576
Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp	
180 185 190	
 cgg ggg gcc ctc tac cgc gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc	624
Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro	
195 200 205	
 ctc tcc cac ctt ccc cga gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc	672
Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu	
210 215 220	
 ctg gtg gcg ggc cac gag acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt	720
Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe	
225 230 235 240	

```

ctc ctc ctc tcc cac cgc ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc 768
Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
      245              250              255

gag gag gcg gcc ctc gcc gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc 816
Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
      260              265              270

ccc gcc tgg atc ctc acc cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga 864
Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
      275              280              285

gag gac cgg ctc ccc ccg ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg 912
Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
      290              295              300

acc cag agg ctc cac ttc ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc 960
Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
305              310              315              320

ttc ctg gag gaa agg ggg acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc 1008
Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
      325              330              335

ctg ggg cag agg ctc tgc ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc 1056
Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
      340              345              350

ccc atc gtc ctc agg gcc ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc 1104
Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
      355              360              365

ccc ttc ccc cgg gtc ctc gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg 1152
Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
      370              375              380

ctt ccc gcg cgg cct agg gag gag gtg cgg gcg tga 1188
Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
385              390              395

```

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:N-terminal
his tagged

<400> 4

Met His His His His His Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp
 1 5 10 15
 Pro Tyr Leu Lys Asp Leu Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala
 20 25 30
 Trp Gly Arg Ala His Pro Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro
 35 40 45
 Leu Ala Leu Ile Phe Asp Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala
 50 55 60
 Glu Gly Thr Thr Lys Ala Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Thr Gly Arg Gly Leu Leu Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala
 85 90 95
 Arg Lys Ala Leu Lys Asp Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr
 100 105 110
 Arg Glu Ala Met Glu Glu Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg
 115 120 125
 Gly Glu Glu Arg Asp Leu Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Leu Leu Gly Arg Ala Leu Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Glu His Ala Leu Lys Ala Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser
 165 170 175
 Pro Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp
 180 185 190
 Arg Gly Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro
 195 200 205
 Leu Ser His Leu Pro Arg Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu
 210 215 220
 Leu Val Ala Gly His Glu Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Ser His Arg Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser
 245 250 255

Glu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro
260 265 270

Pro Ala Trp Ile Leu Thr Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly
275 280 285

Glu Asp Arg Leu Pro Pro Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val
290 295 300

Thr Gln Arg Leu His Phe Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg
305 310 315 320

Phe Leu Glu Glu Arg Gly Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly
325 330 335

Leu Gly Gln Arg Leu Cys Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly
340 345 350

Pro Ile Val Leu Arg Ala Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu
355 360 365

Pro Phe Pro Arg Val Leu Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly
370 375 380

Leu Pro Ala Arg Pro Arg Glu Glu Val Arg Ala
385 390 395

<210> 5

<211> 1188

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> misc_feature

<222> (1168)..(1185)

<223> His tag

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
His-tagged

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1188)

<400> 5

atg aag cgc ctt tcc ctg agg gag gcc tgg ccc tac ctg aaa gac ctc	48
Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu	
1 5 10 15	
 cag caa gat ccc ctc gcc gtc ctg ctg gcg tgg ggc cgg gcc cac ccc	96
Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro	
20 25 30	
 cgg ctc ttc ctt ccc ctg ccc cgc ttc ccc ctg gcc ctg atc ttt gac	144
Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp	
35 40 45	
 ccc gag ggg gtg gag ggg gcg ctc ctc gcc gag ggg acc acc aag gcc	192
Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala	
50 55 60	
 acc ttc cag tac cgg gcc ctc tcc cgc ctc acg ggg agg ggc ctc ctc	240
Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu	
65 70 75 80	
 acc gac tgg ggg gaa agc tgg aag gag gcg cgc aag gcc ctc aaa gac	288
Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp	
85 90 95	
 ccc ttc ctg ccg aag aac gtc cgc ggc tac cgg gag gcc atg gag gag	336
Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu	
100 105 110	
 gag gcc cgg gcc ttc ttc ggg gag tgg cgg ggg gag gag cgg gac ctg	384
Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu	
115 120 125	
 gac cac gag atg ctc gcc ctc tcc ctg cgc ctc ctc ggg cgg gcc ctc	432
Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu	
130 135 140	
 ttc ggg aag ccc ctc tcc cca agc ctc gcg gag cac gcc ctt aag gcc	480
Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala	
145 150 155 160	
 ctg gac cgg atc atg gcc cag acc agg agc ccc ctg gcc ctc ctg gac	528
Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp	
165 170 175	
 ctg gcc gcc gaa gcc cgc ttc cgg aag gac cgg ggg gcc ctc tac cgc	576
Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg	
180 185 190	

gag gcg gaa gcc ctc atc gtc cac ccg ccc ctc tcc cac ctt ccc cga	624
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg	
195 200 205	
gag cgc gcc ctg agc gag gcc gtg acc ctc ctg gtg gcg ggc cac gag	672
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu	
210 215 220	
acg gtg gcg agc gcc ctc acc tgg tcc ttt ctc ctc ctc tcc cac cgc	720
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg	
225 230 235 240	
ccg gac tgg cag aag cgg gtg gcc gag agc gag gag gcg gcc ctc gcc	768
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala	
245 250 255	
gcc ttc cag gag gcc ctg agg ctc tac ccc ccc gcc tgg atc ctc acc	816
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr	
260 265 270	
cgg agg ctg gaa agg ccc ctc ctc ctg gga gag gac cgg ctc ccc ccg	864
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro	
275 280 285	
ggc acc acc ctg gtc ctc tcc ccc tac gtg acc cag agg ctc cac ttc	912
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe	
290 295 300	
ccc gat ggg gag gcc ttc cgg ccc gag cgc ttc ctg gag gaa agg ggg	960
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly	
305 310 315 320	
acc cct tcg ggg cgc tac ttc ccc ttt ggc ctg ggg cag agg ctc tgc	1008
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys	
325 330 335	
ctg ggg cgg gac ttc gcc ctc ctc gag ggc ccc atc gtc ctc agg gcc	1056
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala	
340 345 350	
ttc ttc cgc cgc ttc cgc cta gac ccc ctc ccc ttc ccc cgg gtc ctc	1104
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu	
355 360 365	
gcc cag gtc acc ctg agg ccc gaa ggc ggg ctt ccc gcg cgg cct agg	1152
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg	
370 375 380	

gag gag gtg cgg gcg cat cac cat cat cat cac tga
 Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
 385 390 395

1188

<210> 6

<211> 395

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-terminal
 His-tagged

<400> 6

Met Lys Arg Leu Ser Leu Arg Glu Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Gln Asp Pro Leu Ala Val Leu Leu Ala Trp Gly Arg Ala His Pro
 20 25 30

Arg Leu Phe Leu Pro Leu Pro Arg Phe Pro Leu Ala Leu Ile Phe Asp
 35 40 45

Pro Glu Gly Val Glu Gly Ala Leu Leu Ala Glu Gly Thr Thr Lys Ala
 50 55 60

Thr Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Arg Leu Thr Gly Arg Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Trp Gly Glu Ser Trp Lys Glu Ala Arg Lys Ala Leu Lys Asp
 85 90 95

Pro Phe Leu Pro Lys Asn Val Arg Gly Tyr Arg Glu Ala Met Glu Glu
 100 105 110

Glu Ala Arg Ala Phe Phe Gly Glu Trp Arg Gly Glu Glu Arg Asp Leu
 115 120 125

Asp His Glu Met Leu Ala Leu Ser Leu Arg Leu Leu Gly Arg Ala Leu
 130 135 140

Phe Gly Lys Pro Leu Ser Pro Ser Leu Ala Glu His Ala Leu Lys Ala
 145 150 155 160

Leu Asp Arg Ile Met Ala Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala Leu Leu Asp
 165 170 175

Leu Ala Ala Glu Ala Arg Phe Arg Lys Asp Arg Gly Ala Leu Tyr Arg

180 185 190
Glu Ala Glu Ala Leu Ile Val His Pro Pro Leu Ser His Leu Pro Arg
195 200 205
Glu Arg Ala Leu Ser Glu Ala Val Thr Leu Leu Val Ala Gly His Glu
210 215 220
Thr Val Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Phe Leu Leu Leu Ser His Arg
225 230 235 240
Pro Asp Trp Gln Lys Arg Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ala Leu Ala
245 250 255
Ala Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp Ile Leu Thr
260 265 270
Arg Arg Leu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Gly Glu Asp Arg Leu Pro Pro
275 280 285
Gly Thr Thr Leu Val Leu Ser Pro Tyr Val Thr Gln Arg Leu His Phe
290 295 300
Pro Asp Gly Glu Ala Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu Arg Gly
305 310 315 320
Thr Pro Ser Gly Arg Tyr Phe Pro Phe Gly Leu Gly Gln Arg Leu Cys
325 330 335
Leu Gly Arg Asp Phe Ala Leu Leu Glu Gly Pro Ile Val Leu Arg Ala
340 345 350
Phe Phe Arg Arg Phe Arg Leu Asp Pro Leu Pro Phe Pro Arg Val Leu
355 360 365
Ala Gln Val Thr Leu Arg Pro Glu Gly Gly Leu Pro Ala Arg Pro Arg
370 375 380
Glu Glu Val Arg Ala His His His His His His
385 390 395

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 7

cgaagctcat atgaagcgcc tttccctgag

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 8

gcgaattcac gcccgcacct cctccctagg

30

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 9

cgaagctcat atgcatcacc atcatcatca caagcgctt tc

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 10

cggaattcag tgatgatgat ggtgatgcgc ccgcacctcc tc

42

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 11

ccggaattca tgaagcgcct ttccctgagg

30

<210> 12

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:PCR-Primer

<400> 12

ccaatgcatt ggttctgcag tcaggcccg c acctcctccc tagg

44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P23/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHOEFS A B B ET AL: "Astaxanthin accumulation in Haematococcus requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 500, no. 3, 6 July 2001 (2001-07-06), pages 125-128, XP004251391 ISSN: 0014-5793	1
Y	the entire document, in particular Abstract and page 127, Paragraph 3.2 and page 128, Lines 4-5 --- -/--	2-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08199

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/051998 A1 (SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA ET AL) 2 May 2002 (2002-05-02)	1
Y	the entire document, in particular page 12, paragraphs 0109-0110 and page 37, paragraphs 03337 and 0341	2-20
Y	DE 100 51 175 A (BASF AG) 2 May 2002 (2002-05-02) the whole document	2-20
Y	SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA: "Engineering novel carotenoids in microorganisms" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 11, no. 3, June 2000 (2000-06), pages 255-261, XP002261192 ISSN: 0958-1669 the whole document	2-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08199

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 2002051998	A1	02-05-2002	AU	2257401 A	18-06-2001
			EP	1238068 A1	11-09-2002
			WO	0142455 A1	14-06-2001
<hr/>					
DE 10051175	A	02-05-2002	DE	10051175 A1	02-05-2002
			AU	1904002 A	29-04-2002
			CA	2425927 A1	14-04-2003
			WO	0233057 A2	25-04-2002
			EP	1326984 A2	16-07-2003
			NO	20031616 A	13-06-2003
<hr/>					

PCT/EP 03/08199

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P23/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHOEFS A B B ET AL: "Astaxanthin accumulation in Haematococcus requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 500, Nr. 3, 6. Juli 2001 (2001-07-06), Seiten 125-128, XP004251391 ISSN: 0014-5793	1
Y	das ganze Dokument, vor allem Zusammenfassung und S. 127, Absatz 3.2 and S. 128, Zeilen 4-5	2-20
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lüdemann, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2002/051998 A1 (SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA ET AL) 2. Mai 2002 (2002-05-02)	1
Y	das ganze Dokument, vor allem S. 12, Absätze 0109-0110 and S. 37, Absätze 0337 und 0341	2-20
Y	---- DE 100 51 175 A (BASF AG) 2. Mai 2002 (2002-05-02) das ganze Dokument	2-20
Y	---- SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA: "Engineering novel carotenoids in microorganisms" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 11, Nr. 3, Juni 2000 (2000-06), Seiten 255-261, XP002261192 ISSN: 0958-1669 das ganze Dokument -----	2-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 03/08199

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2002051998	A1	02-05-2002	AU	2257401 A	18-06-2001
			EP	1238068 A1	11-09-2002
			WO	0142455 A1	14-06-2001
<hr/>					
DE 10051175	A	02-05-2002	DE	10051175 A1	02-05-2002
			AU	1904002 A	29-04-2002
			CA	2425927 A1	14-04-2003
			WO	0233057 A2	25-04-2002
			EP	1326984 A2	16-07-2003
			NO	20031616 A	13-06-2003
<hr/>					